

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 757 278

(21) N° d'enregistrement national :

97 07469

(51) Int Cl⁶ : G 02 B 21/18, G 02 B 21/22

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 17.06.97.

(30) Priorité : 12.12.96 FR 9615255.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 19.06.98 Bulletin 98/25.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Ce dernier n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : LAUER VINCENT — FR.

(72) Inventeur(s) :

(73) Titulaire(s) :

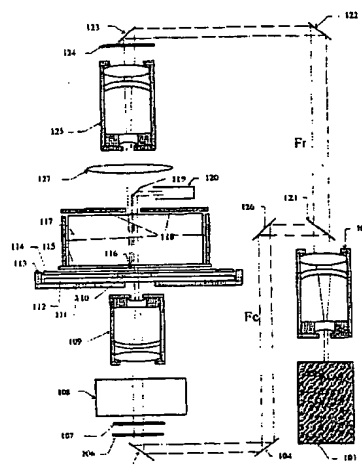
(74) Mandataire :

(54) MICROSCOPE ENREGISTRANT L'ONDE DIFFRACTÉE PAR L'OBJET OBSERVÉ ET L'UTILISANT POUR
CALCULER UNE REPRÉSENTATION EN TROIS DIMENSIONS DE CET OBJET.

(57) Microscope enregistrant l'onde diffractée par l'objet
observé et l'utilisant pour calculer une représentation en
trois dimensions de cet objet.

L'invention concerne un microscope qui enregistre sur
une surface de capteurs (118) les figures d'interférences
produites par une faisceau de référence Fr, par exemple
obtenu par réflexion sur une bille (116), et un faisceau Fe
traversant un échantillon (110). Ce microscope calcule en-
suite, par des moyens informatiques, une représentation
tridimensionnelle de l'objet à partir de ces figures d'interfé-
rences.

Application: microscopie en biologie ou métrologie.



FR 2 757 278 - A1



La présente invention concerne un microscope.

Les microscopes existants utilisent tous des lentilles qui forment par un procédé optique une image bidimensionnelle correspondant à une coupe agrandie de l'objet observé. Cette image peut le cas échéant être enregistrée par une caméra vidéo afin de pouvoir être restituée ultérieurement.

5 Certains de ces microscopes sont munis de dispositifs permettant de générer des images en trois dimensions. Les images 3D sont alors obtenues par calcul à partir d'une série d'images 2D, qui sont des coupes différant par la profondeur ou l'angle d'observation.

Par ailleurs, il existe des microscopes interférométriques utilisant une onde de référence et une onde diffractée dont la superposition fournit une image. Ces dispositifs produisent des images
10 bidimensionnelles semblables à celles produites par un microscope ordinaire, à ceci près que les variations d'éclairement de l'image ne sont pas caractéristiques de l'absorptivité de l'échantillon mais des variations locales de phase. Ces dispositifs ne permettent pas d'obtenir d'images en trois dimensions.

Il existe également des systèmes de prise de vue holographique enregistrant une image
15 microscopique tridimensionnelle, mais ces systèmes ne permettent pas l'enregistrement de l'information sous forme numérique et l'image reconstituée doit être observée elle-même au microscope. En effet le pas d'analyse pour un enregistrement holographique doit être inférieur à la longueur d'onde, ce qui est hors de portée des systèmes de conversion optique-numérique actuels.

L'invention permet d'obtenir une représentation en trois dimensions de l'objet et une
20 représentation complète de l'onde diffractée par celui-ci, le tout sous forme numérique autorisant ensuite tout mode de représentation et tout type d'analyse. Elle permet d'obtenir ces résultats en un temps très court: au maximum trois enregistrements sur un ensemble de capteurs CCD sont nécessaires pour obtenir une image, alors que la superposition de nombreuses images 2D serait nécessaire avec des méthodes classiques.

25 Le principe de l'invention est d'enregistrer l'onde diffractée par l'objet et de calculer à partir de cet enregistrement une représentation tridimensionnelle de l'objet. Cependant, l'onde diffractée par l'objet correspond à une valeur complexe qui ne peut pas être enregistrée directement. On ne peut enregistrer directement que des intensités correspondant soit à l'onde diffractée seule soit à la superposition de cette onde diffractée et d'une onde de référence. Il est donc nécessaire de se contenter
30 de ce type d'enregistrements pour calculer la représentation tridimensionnelle.

Bien que la valeur complexe de l'onde diffractée par l'objet ne soit pas accessible directement, il est intéressant de la calculer, ou du moins d'en calculer une approximation, à partir d'enregistrements d'intensité. La représentation tridimensionnelle de l'objet peut alors être obtenue à partir de cette onde par un calcul simple appliquant le principe de retour inverse de la lumière.

35 Une solution permettant d'accéder à la valeur complexe de l'onde diffractée par l'objet est de la faire interférer avec une onde de référence, suivant le principe de l'holographie. A partir de la figure d'interférences enregistrée, on obtient alors une approximation de l'onde diffractée par l'objet, au sens

ou le calcul de la représentation tridimensionnelle de l'objet à partir de cette onde produit une approximation de la représentation qui serait obtenue à partir de l'onde exacte.

Pour éviter ce type d'approximations, il est avantageux de pouvoir obtenir la valeur exacte de l'onde lumineuse issue de l'objet seul. Ceci est facilité par l'enregistrement successif de plusieurs figures d'interférences différant entre elles par la différence de phase entre l'onde de référence et l'onde diffractée par l'objet. En particulier, on peut enregistrer, pour obtenir une représentation tridimensionnelle, trois figures d'interférence successives en faisant varier à chaque fois de 120 degrés la phase de l'onde de référence. L'onde lumineuse issue de l'objet seul peut alors être obtenue par une formule simple, linéaire, à partir des trois enregistrements d'intensité.

10 Pour pouvoir enregistrer un hologramme sous forme numérique plutôt que sur une émulsion à grain fin, il faut que les franges d'interférence soient suffisamment larges. Ceci est obtenu, dans le cadre de l'invention, en générant une onde de référence approximativement sphérique et centrée sur un point voisin de l'objet à observer ou d'une image intermédiaire de cet objet. La largeur des franges d'interférences produites par l'objet et cette onde est alors suffisante pour un enregistrement numérique.

15 La figure d'interférences produite peut être directement enregistrée par des capteurs situés à proximité de l'objet, sans interposition d'éléments optiques qui modifieraient le trajet de la lumière. L'onde se propageant ainsi à travers un milieu d'indice constant, il est aisé par la suite d'en calculer le trajet inverse. Dans ce cas, on peut utiliser pour générer l'onde de référence une petite bille réfléchissante située à proximité de l'objet à observer. Un faisceau laser est dirigé vers cette bille qui le réfléchit dans toutes les directions. Ceci produit une onde approximativement sphérique centrée sur la bille, donc près de l'objet.

Une autre solution est de former une image intermédiaire de l'objet à l'aide d'un objectif de microscope. Cette méthode permet de filtrer spatialement l'image intermédiaire par interposition d'un diaphragme dont l'ouverture détermine la taille de la partie observée de l'objet. En diminuant la taille d'image observée, on diminue la surface de capteurs nécessaire. L'image intermédiaire peut être de dimensions égales à celle de l'objet, mais il est plus avantageux d'utiliser une image agrandie par rapport à l'objet, dans laquelle l'inclinaison des rayons par rapport à l'axe est moindre, ce qui facilite l'utilisation de lentilles. Dans ce cas, un système de lentilles situé derrière le diaphragme et convenablement dimensionné permet de former sur un capteur CCD une figure d'interférences telle qu'à chaque point du capteur corresponde une seule fréquence de l'onde issue de l'objet observé. L'onde de référence peut être superposée à l'onde issue de l'objet en utilisant un miroir semi-transparent. L'onde de référence doit alors avoir un point d'origine virtuel dans la partie observée de l'objet.

35 Dans les opérations de calcul de la représentation tridimensionnelle de l'objet, il importe de connaître avec précision la phase de l'onde de référence et la position des capteurs. Ceci peut être réalisé en utilisant un objet de caractéristiques connues, par exemple une source ponctuelle. L'enregistrement de la figure d'interférence obtenue permet alors de déterminer la phase de l'onde de référence. En

déplaçant la source ponctuelle dans le champ d'observation, on obtient également les variations de phase qui en résultent sur les capteurs, qui sont liées à la position des capteurs.

L'obtention d'une onde de référence distincte de l'onde d'éclairage implique une certaine complexité du système. Une solution particulièrement simplifiée consiste à utiliser comme onde de
5 référence la partie non diffractée de l'onde d'éclairage, ce qui revient à ne pas avoir d'onde de référence distincte, les interférences étant directement produites par l'onde lumineuse ayant traversé l'objet. Dans ce cas, on doit travailler à partir d'un seul enregistrement, et on utilise donc pour l'onde diffractée l'expression approchée obtenue à partir d'une seule figure d'interférence.

Pour effectuer les décalages de phase de l'onde de référence, il est possible d'utiliser un
10 dispositif basé sur l'utilisation de l'effet électro-optique. On utilise à cette fin un cristal dont l'indice suivant les différentes directions de polarisation varie linéairement en fonction du champ électrique appliqué au cristal. Il est particulièrement intéressant d'utiliser un cristal biréfringent uniaxial dont les indices correspondant aux directions de polarisation orthogonales à l'axe optique varient lors de l'application d'un champ électrique selon l'axe optique, tout en restant égaux entre eux. On peut alors
15 utiliser une lame de cristal dont l'axe optique est orthogonal aux faces de la lame, et dont les faces sont recouvertes d'une matière conductrice transmettant bien la lumière. L'application d'une différence de potentiel électrique entre les deux faces permet de faire varier la phase d'une onde se propageant suivant l'axe optique. Il est également possible d'utiliser un miroir piézo-électrique sur lequel l'onde se réfléchit à angle droit. En faisant varier la position du miroir on fait varier le décalage de phase entre les ondes.

A partir de l'onde lumineuse issue de l'objet seul ou de son approximation si une seule figure
20 d'interférences a été utilisée, il est possible de reconstituer point par point une représentation en trois dimensions de l'objet en calculant l'onde lumineuse dans cette objet par application du principe de retour inverse de la lumière. Le calcul point par point sur une zone suffisamment importante de l'objet demanderait un temps de calcul beaucoup trop élevé. Afin d'effectuer cette opération pour une portion
25 suffisante de l'objet et avec un temps de calcul raisonnable, on peut d'abord générer la représentation fréquentielle de la partie d'objet considérée puis effectuer une transformée de Fourier rapide inverse pour retrouver une représentation tridimensionnelle classique. Le système de calcul permettant cette opération peut être constitué d'un simple processeur mais il est également possible, pour accélérer le traitement, d'incorporer des moyens dédiés comme des "processeurs de FFT", spécialisés dans la
30 transformée de Fourier rapide, ou des Asics dédiés.

La représentation en trois dimensions obtenue se présente comme une grandeur complexe fonction des trois coordonnées spatiales, correspondant à la vibration lumineuse en tout point de l'objet. A partir de cette représentation, il est possible de générer tout type d'image en deux dimensions. En particulier, on pourra générer deux images permettant une vision stéréoscopique de l'objet observé.
35 L'observateur pourra alors faire tourner l'image sous tous les angles souhaités, un changement d'angle d'observation se traduisant simplement par un calcul de projection différent.

La représentation en trois dimensions est monochrome. Toutefois il est possible d'obtenir une représentation en couleurs en enregistrement successivement plusieurs représentations monochromes correspondant à des longueurs d'onde différentes. Il est nécessaire pour cela de pouvoir commuter entre plusieurs faisceaux d'éclairage provenant de lasers distincts. Ceci peut se faire en utilisant plusieurs lasers et en "mélangeant" les faisceaux issus de ces lasers à l'aide de miroirs semi-transparents. Des commutateurs électro-optiques placés sur le trajet de chaque faisceau permettent de sélectionner la longueur d'onde utilisée pour chaque prise d'image.

Les figures 1 à 6 illustrent un mode de réalisation de l'invention utilisant une onde de référence créée par réflexion sur une bille réfléchissante. La Fig. 1 représente une vue d'ensemble du système optique. La Fig. 2 représente un exemple de dimensionnement de la partie comprenant la bille et l'échantillon. La Fig. 3 représente l'arrangement des capteurs. La Fig. 4 représente un système permettant de générer une figure d'interférence correspondant à un point matériel, utile dans une procédure de calibrage du microscope. La Fig. 5 représente l'organisation globale de la partie électronique et informatique du système. La figure 6 représente le dispositif de contrôle de phase utilisé.

La figure 7 illustre un deuxième mode de réalisation de l'invention, différant du premier par l'absence d'onde de référence. La figure 8 illustre un troisième mode de réalisation différant du premier par l'existence d'un objectif de microscope créant une image intermédiaire et d'un système de lentilles formant une figure de diffraction dans le plan d'un CCD à partir de cette image intermédiaire. La figure 9 représente un dispositif de génération du faisceau laser utilisé pour obtenir une image en couleurs.

Selon le premier mode de réalisation:

Un laser hélium-néon (101) produit un faisceau. Ce faisceau traverse d'abord un élargisseur de faisceau (103). Il est alors séparé en deux faisceaux d'égale intensité par une lame semi-transparente (121). Après cette lame on distingue le faisceau de référence (Fr) et le faisceau d'éclairage (Fe).

Le faisceau d'éclairage est redirigé par des miroirs (126), (104), (105), traverse un filtre (106), une lame demi-onde (107), dont un axe neutre est orthogonal au plan de la figure, un dispositif de contrôle de phase (108) et un collimateur (109) diminuant la largeur du faisceau, et est finalement dirigé vers l'échantillon (110) qu'il éclaire par le dessous. A sa sortie de l'échantillon la partie non diffractée du faisceau est redirigée par un miroir (119) vers une cavité absorbante (120).

Le faisceau de référence est redirigé par les miroirs (122) et (123), traverse un filtre (124) et un collimateur (125) diminuant la largeur du faisceau (typiquement 1 mm de diamètre en sortie). Ce faisceau traverse ensuite une lentille convergente (127) dont le point de focalisation est légèrement derrière la bille (116). Le faisceau produit va frapper la bille (116) qui le réfléchit dans toutes les directions.

Les miroirs (121) et (126) doivent être positionnés entre les miroirs (104) et (122) de manière à ce que les chemins optiques parcourus par les faisceaux d'éclairage et de référence à leur arrivée au voisinage de l'échantillon soient égaux.

La bille réfléchit le faisceau de référence dans toutes les directions et l'échantillon diffracte le faisceau d'éclairage dans toutes les directions. Le faisceau de référence et le faisceau diffracté vont alors interférer et former une figure d'interférence sur les capteurs CCD (118).

L'échantillon (110) se trouve compris entre une lame (112) et une lamelle (114), elles-mêmes
 5 fixées sur un porte-échantillon (111) muni de rebords (113) empêchant la lame et la lamelle de bouger transversalement par rapport au porte-échantillon. La bille est elle-même incluse dans une lamelle (114) fixe par rapport au demi-cube transparent (118) sur les côtés duquel sont fixés les capteurs. Une couche d'huile d'indice proche de celui du demi-cube peut être interposée entre la lamelle couvrant l'échantillon et celle contenant la bille, de manière à minimiser les changements d'indice. L'utilité du
 10 demi-cube est de minimiser les changements d'indice intervenant entre l'objet éclairé et les capteurs. Les indices des différentes lamelles utilisées, de l'huile et du demi-cube, doivent donc être égaux ou proches les uns des autres, et si possible proches de l'indice moyen de l'échantillon lui-même. Le diamètre de la bille, la largeur et le degré de convergence du faisceau de référence arrivant sur cette bille, doivent être réglés de manière à ce que le faisceau soit réfléchi dans tout le demi-plan supérieur
 15 mais n'atteigne pas l'échantillon, situé dans le demi-plan inférieur. Les surfaces du porte-échantillon doivent absorber la longueur d'onde du laser afin de limiter les effets parasites.

La Figure 2 détaille la zone de l'échantillon et de la bille. Le faisceau de référence arrivant sur la bille (116) a un point de focalisation (20) sous la bille. Ceci permet de bien contrôler la zone éclairée de la bille, la largeur de la tache de focalisation étant inférieure à celle de la bille. L'axe du faisceau
 20 d'éclairage n'est pas parallèle à celui du faisceau de référence. Il est parallèle au rayon le plus externe de ce faisceau. Ceci permet d'éviter que le faisceau d'éclairage "croise" le faisceau de référence, ce qui ne permettrait pas sa redirection par le miroir (119). L'axe optique des éléments (125) (127) et celui de (109) n'ont donc pas exactement la même orientation. Les dimensions sont données à titre d'exemple. La bille perturbe l'onde diffractée par l'objet et donc doit être aussi petite que possible. Cependant, plus
 25 la bille est petite plus la tache de focalisation doit être petite et donc plus le faisceau sortant de (125) doit être large, ce qui impose une zone non utilisable plus grande entre les capteurs, pour laisser passer ce faisceau. De plus il est difficile de focaliser le faisceau sur une bille trop petite. La taille de la bille et la largeur du faisceau sortant de (125) sont un compromis entre ces contraintes.

Des capteurs CCD spécialement dédiés, non packagés, sont utilisés. La figure 3 représente
 30 l'arrangement des capteurs. Sur un capteur, la largeur de la bande inutilisée (31) doit être minimisée par rapport à la surface de réception (32). Les points de connexion doivent tous ressortir du même côté du capteur (33). La vue de dessus et la vue de côté permettent de bien comprendre l'arrangement des capteurs, qui laisse toutes les surfaces de connexion accessibles tout en entourant complètement le demi-cube par des surfaces de réception et en ménageant une ouverture pour le passage des faisceaux

35 laser. Le nombre N_{pix} de pixels suivant la plus petite largeur d'un capteur doit vérifier $N_{pix} = 2\alpha \frac{r}{\lambda}$

ou r est le rayon d'une sphère contenant à la fois la partie illuminée de l'échantillon et la bille

réfléchissante, λ est la longueur d'onde dans le demi cube (118) du laser utilisé, et α est un nombre supérieur à 1, par exemple 1,4. Ici ce nombre de pixels vaut approximativement 1000. Les capteurs utilisés sont du type "à transfert d'image interligne" qui permet l'utilisation dans de bonnes conditions de l'obturation électronique.

- 5 L'ensemble du dispositif optique est enfermé dans une enceinte non représentée le protégeant de la lumière externe. Il doit également être isolé des vibrations externes.

Le dispositif de contrôle de phase permet d'effectuer des décalages de phase de $0, \frac{2\pi}{3}, \frac{4\pi}{3}$

sur l'onde de référence. La figure 6 présente un dispositif de ce type. Il est composé d'une "lame" (60) en cristal de LiNbO_3 . Ce cristal est biréfringent uniaxial et son axe optique doit être dirigé suivant le

- 10 vecteur u orthogonal aux faces de la lame. Les deux faces de la lame (60) sont recouvertes de couches d'ITO ("Indium-Tin Oxide", oxyde d'indium et d'étain) d'environ 100 nm d'épaisseur (61) et (62). De telles couches d'ITO sont couramment utilisées dans les afficheurs à cristaux liquides. L'ensemble est serré entre des plaques métalliques percées en leur centre (63)(64) qui assurent un bon contact électrique entre l'alimentation et la couche d'ITO.

- 15 Pour créer le déphasage, on applique entre les deux couches d'ITO une différence de potentiel $V = V_{(62)} - V_{(61)}$. La différence de potentiel à appliquer pour obtenir un déphasage de Δ radians est:

$$V(\Delta) = \frac{\Delta}{\pi} \frac{\lambda}{n_0^3 r_{13}}$$

ou λ est la longueur d'onde du laser utilisé, n_0 l'indice de la lame en l'absence de champ pour un faisceau se dirigeant suivant l'axe optique, et r_{13} un coefficient caractéristique de l'effet magnéto-

- 20 optique. Pour une longueur d'onde du laser de 633 nm, on a $r_{13} = 8,6 \cdot 10^{-12} \text{ m/V}$ et $n_0 = 2,297$. ce

qui mène à: $V\left(\frac{2\pi}{3}\right) = 4043 \text{ V}$. Le décalage de phase de $\frac{4\pi}{3}$ sera en réalité obtenu comme un

décalage de $-\frac{2\pi}{3}$ et la correspondance décalage de phase- tension est donc donnée par:

Déphasage	Tension (V) (formule de calcul)	Tension (V) valeur numérique pour $\lambda = 633 \text{ nm}$
0	0	0
$\frac{2\pi}{3}$	$\frac{2}{3} \frac{\lambda}{n_0^3 r_{13}}$	4043

$\frac{4\pi}{3}$	$-\frac{2}{3} \frac{\lambda}{n_0^3 r_{13}}$	-4043
------------------	---	-------

- Ce dispositif de décalage de phase particulièrement bien adapté peut être remplacé par des dispositifs connus, à base par exemple de cristaux liquides ou de cristaux sensibles à l'effet électro-optique et utilisés dans d'autres configurations. De tels dispositifs agissent en général différemment sur les deux polarisations. Ils ne sont donc directement utilisables qu'en lumière polarisée. Toutefois, il est possible de combiner plusieurs dispositifs pour obtenir un retard indépendant de la direction. Par exemple on peut combiner deux dispositifs en les plaçant en série de sorte qu'ils soient traversés successivement par le faisceau. Le deuxième dispositif doit alors être semblable au premier mais doit être tourné de 90 degrés autour de l'axe du faisceau. De la sorte les retards induits selon les deux polarisations après traversée successive des deux dispositifs s'égalisent, et on a donc un retard indépendant de la polarisation. Cette configuration n'est valide que si les décalages de phase induits selon les deux directions de polarisation ne sont pas opposés.

Les filtres présents sur le trajet des deux faisceaux permettent de régler le rapport de leurs intensités de la manière la mieux adaptée.

- Le jeu de miroirs formant le faisceau d'éclairage agit différemment sur les deux composantes de champ électrique correspondant à l'onde lumineuse, introduisant un déphasage de π entre la composante située dans un plan orthogonal à celui de la figure et la composante située dans le plan de la figure. La lame demi-onde (107) permet de compenser cet effet. Elle peut éventuellement être supprimée si on utilise un laser ayant une polarisation rectiligne selon un vecteur orthogonal ou parallèle au plan de la figure.

- Une électronique appropriée (Fig.5), du même type que celle utilisée dans une caméra numérique, génère tous les signaux de contrôle des capteurs CCD et permet à un ordinateur de recevoir par l'intermédiaire d'une mémoire vidéo (VRAM) les images prises par les capteurs et échantillonnées par les convertisseurs analogique-numérique (CAN). Cette électronique contrôle également la tension appliquée au dispositif de décalage de phase. Elle reçoit un signal d'une horloge (TIMER) à partir duquel elle séquence l'ensemble des opérations.

Une prise d'image se déroule comme suit, le décalage de phase étant initialement à zéro, soit une tension $V=0$.

T0: début du premier temps d'intégration des capteurs.

- T0+T1: fin du premier temps d'intégration des capteurs, début du transfert de la première image des capteurs vers la VRAM, réglage du décalage de phase à $\frac{2\pi}{3}$.

T0+T1+T2: Fin du transfert de la première image et début du deuxième temps d'intégration des capteurs.

$T0+2T1+T2$: fin du deuxième temps d'intégration des capteurs, début du transfert de la deuxième image des capteurs vers la VRAM, réglage du décalage de phase à $\frac{4\pi}{3}$.

$T0+2T1+2T2$: Fin du transfert de la deuxième image et début du troisième temps d'intégration des capteurs.

- 5 $T0+3T1+2T2$: fin du troisième temps d'intégration des capteurs, début du transfert de la troisième image des capteurs vers la VRAM, réglage du décalage de phase à 0.

$T0+3T1+3T2$: Fin du transfert de la troisième image

$T0+T3$: début du cycle suivant.

- ou $T1$ est le temps d'intégration des capteurs, $T2$ est le temps de transfert des données des capteurs vers la VRAM, $T3$ est l'intervalle de temps entre deux images.

Le traitement, effectué par l'ordinateur, consiste à générer une représentation en trois dimensions à partir des figures d'interférence enregistrées. Ceci est fait en recalculant à partir des trois images décalées en phase l'onde lumineuse associée à l'objet diffractant seul, puis en recalculant la vibration lumineuse dans l'objet par retour inverse de la lumière.

- 15 La vibration lumineuse associée à l'objet seul, en un point P de la surface de réception, vaut:

$$s(P) = e^{j\theta_{ref}(P)} S(P)$$

ou $\theta_{ref}(P)$ est la phase de l'onde de référence au point P .

On montre, compte tenu de la disposition des capteurs, que la fréquence spatiale maximale du signal $S(P)$ sur la surface d'un capteur est $f_{\max} = \frac{r}{\lambda L}$ ou L est la largeur de la zone active du

- 20 capteur et r est le rayon d'une sphère contenant la bille et la partie illuminée de l'échantillon. Afin de pouvoir reconstituer ce signal il est nécessaire de l'échantillonner à une fréquence spatiale $2\alpha f_{\max}$ avec $\alpha > 1$. On pourra par exemple prendre $\alpha = 1,4$. Ceci implique que le nombre de pixels dans la

largeur du capteur soit $N_{pix} = 2\alpha f_{\max} L$, soit $N_{pix} = 2\alpha \frac{r}{\lambda}$. La première étape du calcul de

$S(P)$ est alors le calcul sur chaque pixel Q du signal $S_{pix}(Q)$ correspondant à la valeur de $S(P)$ au

- 25 centre du pixel Q , calculée comme si le capteur ne filtrait pas le signal d'intensité reçue. On montre que cette valeur est donnée par:

$$S_{pix}(Q) = \frac{1}{\sqrt{I_{ref}(P)}} \left[\frac{1}{6} \left(2I(Q,0) - I\left(Q, \frac{2\pi}{3}\right) - I\left(Q, -\frac{2\pi}{3}\right) \right) + j \frac{1}{2\sqrt{3}} \left(I\left(Q, \frac{2\pi}{3}\right) - I\left(Q, -\frac{2\pi}{3}\right) \right) \right]$$

ou $I(Q, \theta)$ est l'intensité lumineuse reçue sur le pixel Q pour un décalage en phase θ entre le faisceau d'éclairage et le faisceau de référence, et $I_{ref}(Q)$ est l'intensité de l'onde de référence mesurée sur le pixel Q .

- La reconstitution du signal $S(P)$ à partir de $S_{pix}(Q)$ implique de suréchantillonner ce signal, de couper les fréquences spatiales supérieures en valeur absolue à f_{max} , et d'inverser la fonction de transfert du capteur. Ces opérations classiques de traitement du signal permettent finalement d'obtenir la valeur exacte de $S(P)$ sur un ensemble de points suréchantillonné. Le facteur de suréchantillonnage peut par exemple être de $n_s = 4$. Dans la suite du texte, afin d'éviter toute confusion, on notera toujours Q les points variant sur l'ensemble des pixels, au nombre de N_{pix} dans la largeur du capteur, et P les points variant sur l'ensemble suréchantillonné, au nombre de $n_s N_{pix}$.

La vibration lumineuse qui en résulte par retour inverse de la lumière, en un point M quelconque est alors:

$$v(M) = \sum_P G(P) e^{j \frac{2\pi}{\lambda} (OP - MP)} S(P)$$

- ou MP est la distance entre les points M et P , O est un point fixe suffisamment proche de la bille, λ la longueur d'onde dans le cube (118) du laser utilisé, et où la sommation est étendue à tous les points P de la surface de réception, et avec:

$$G(P) = \frac{\overline{S_o(P)}}{|S_o(P)|} = e^{j(\theta_{ref}(P) - 2\pi \frac{OP}{\lambda})} \quad (\text{on rappelle que } \bar{X} \text{ désigne le conjugué de } X).$$

ou $S_o(P)$ est la fonction $S(P)$ obtenue lorsque l'objet observé est une source ponctuelle confondue avec O .

- La phase de la contribution du point P de la surface de réception à la vibration lumineuse au point M de l'objet est alors:

$$\begin{aligned} \theta(M, P) = & -\frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{(x_P - x_M)^2 + (y_P - y_M)^2 + (z_P - z_M)^2} \\ & + \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{(x_P - x_O)^2 + (y_P - y_O)^2 + (z_P - z_O)^2} + \text{Arg}(S(P)) + \text{Arg}(G(P)) \end{aligned}$$

- Dans un voisinage de M cette phase varie linéairement suivant les différentes directions, générant les fréquences suivantes:

$$f_x(M, P) = \frac{1}{\lambda} \frac{x_P - x_M}{\sqrt{(x_P - x_M)^2 + (y_P - y_M)^2 + (z_P - z_M)^2}}$$

$$f_x(M, P) = \frac{1}{\lambda} \frac{y_P - y_M}{\sqrt{(x_P - x_M)^2 + (y_P - y_M)^2 + (z_P - z_M)^2}}$$

$$f_z(M, P) = \frac{1}{\lambda} \frac{z_P - z_M}{\sqrt{(x_P - x_M)^2 + (y_P - y_M)^2 + (z_P - z_M)^2}}$$

- L'algorithme utilise ces relations pour générer une représentation tridimensionnelle. Il génère d'abord cette représentation dans le domaine fréquentiel, par superposition des fréquences issues des différents points des capteurs, puis effectue une transformée de Fourier rapide pour obtenir l'image dans le domaine spatial.

L'image est calculée au pas de $\frac{\lambda}{2n}$ sur une distance $\frac{N\lambda}{n}$, n et N étant des entiers

- caractérisant cette discrétisation de l'image. L'image en fréquence discrétisée constitue un tableau \tilde{H} dont les indices varient entre $-N$ et $N-1$. L'algorithme génère ce tableau en parcourant l'ensemble des points P et en effectuant pour chaque point P l'opération:

$$\tilde{H} \left[E \left(\frac{N}{n} f_x(M, P) \right), E \left(\frac{N}{n} f_y(M, P) \right), E \left(\frac{N}{n} f_z(M, P) \right) \right]_+ = S(P)G(P) e^{j \frac{2\pi}{\lambda} \left(-\sqrt{(x_P - x_M)^2 + (y_P - y_M)^2 + (z_P - z_M)^2} + \sqrt{(x_P - x_O)^2 + (y_P - y_O)^2 + (z_P - z_O)^2} \right)}$$

où "+" désigne l'opération d'ajout à la valeur initiale et E la partie entière, et où le tableau \tilde{H} est initialisé à zéro.

- Le tableau H est ensuite généré à partir de \tilde{H} par transformée de Fourier rapide inverse.

Cette méthode est valide si l'approximation de "fréquence constante" est valide. Si la représentation tridimensionnelle finale est échantillonnée par pas de $\frac{\lambda}{2n}$ ceci implique que la fréquence ne doit pas varier de plus de $\frac{n}{2N\lambda}$ sur une longueur $\frac{N\lambda}{2n}$, ce qui mène à la condition:

$$\frac{N}{n} \leq \sqrt{\frac{MP}{\lambda}}. \text{ Une valeur typique, pour notre système, est obtenue pour } MP=1\text{cm et } \lambda=0.5\text{mm:}$$

- $\frac{N}{n} \leq 140$. On peut par exemple utiliser les valeurs $n=2$ et $N=256$, ce qui nous fera générer une représentation tridimensionnelle de 128 longueurs d'onde de côté.

- Pour effectuer les opérations précédentes correctement, il est nécessaire de connaître la position des capteurs avec précision. Il est également nécessaire de déterminer la fonction G . La détermination des paramètres de position et de la fonction G constitue une opération de calibrage dont les résultats doivent être incorporés au logiciel livré avec l'appareil. Pour la détermination de ces valeurs on enlève

dans le microscope le collimateur (109) et le porte-échantillon et on les remplace par le dispositif de la Figure 4 qui doit être lui-même solidaire d'un micropositionneur trois axes. Ce dispositif est un objectif de microscope à grande ouverture (41) focalisant le laser sur un "trou" (43) de faibles dimensions pratiqué dans une lame opaque (42) solidaire de l'objectif. Une couche d'huile d'indice proche de celui du demi-cube doit être interposée entre la plaque opaque (43) et la lame (115). Cet ensemble constitue une source quasi ponctuelle de bonne luminosité déplaçable suivant les trois axes. Le micropositionneur doit pour cette opération être interfacé à l'ordinateur qui va en commander les mouvements.

Le système positionne d'abord le dispositif au centre de la zone d'observation, ce qui détermine le point O . $G(P)$ peut alors immédiatement être calculé en tout point P par la formule:

$$10 \quad G(P) = \frac{\overline{S(P)}}{|S(P)|}$$

Pour la détermination des positions des points P on déplace la source ponctuelle générée par le dispositif de la figure-4 autour du point O . Celui-ci constitue donc également le centre du repère dans lequel on va évaluer les positions. On effectue autour du point O des déplacements symétriques d'amplitude a sur chaque axe. a doit être suffisamment faible pour que la distance entre la bille et la

15 source ponctuelle ne dépasse pas la distance $\frac{\lambda N_{\text{pix}}}{a}$. Cependant, plus a est élevé meilleure est la

précision obtenue, donc on a intérêt à maximiser a tout en restant dans la zone autorisée. Les déplacements de la source ponctuelle permettent d'évaluer les grandeurs suivantes:

$$K_x(P) = \frac{\lambda}{2\pi} \frac{1}{2a} \int_{a,0,0}^{a,0,0} d\theta_P$$

$$K_y(P) = \frac{\lambda}{2\pi} \frac{1}{2a} \int_{0,a,0}^{0,a,0} d\theta_P$$

$$20 \quad K_z(P) = \frac{1}{2a} \left(\frac{\lambda}{2\pi} \int_{0,0,a}^{0,0,a} d\theta_P - 2a \right)$$

ou $\int_{x_1, y_1, z_1}^{x_2, y_2, z_2} d\theta_P$ désigne l'intégrale de $d\theta_P$, différentielle de la phase au point P considéré, prise sur

une ligne entre les points de coordonnées (x_1, y_1, z_1) et (x_2, y_2, z_2) .

Pour tout point P , on calcule également $R(P) = OP$, distance entre le point O et le point P considéré. $R(P)$ est calculée à partir de la position géométrique du capteur et du point O , déterminées

25 avec la meilleure précision possible par des mesures classiques. $R(P)$ est donc connu avec une

certaine approximation, mais cette approximation n'entache pas notablement les résultats des calculs.

Par contre il est essentiel d'avoir des rapports $\frac{x(P)}{R(P)} \cdot \frac{y(P)}{R(P)} \cdot \frac{z(P)}{R(P)}$ connus avec la meilleure précision. C'est ce que permettent les équations suivantes:

$$x(P) = -R(P)K_x(P) \sqrt{1 + \left(1 - (K_x(P))^2\right) \left(\frac{a}{R(P)}\right)^2}$$

$$5 \quad y(P) = -R(P)K_y(P) \sqrt{1 + \left(1 - (K_y(P))^2\right) \left(\frac{a}{R(P)}\right)^2}$$

$$z(P) = -R(P)K_z(P) \sqrt{1 + \left(1 - (K_z(P))^2\right) \left(\frac{a}{R(P)}\right)^2}$$

Pour déterminer la position du point P suivant les axes l'algorithme intègre la phase sur ces axes et applique les formules ci-dessus.

Par exemple pour déterminer K_x le micropositionneur déplace la "source ponctuelle" du point
10 de coordonnées $(-a, 0, 0)$ au point de coordonnées $(a, 0, 0)$ par pas de longueur inférieure au quart de la longueur d'onde. A chaque pas n , et pour chaque point P , l'algorithme calcule $S_n(P)$ et en déduit la phase intégrée au point n :

$$\theta_n(P) = \theta_{n-1}(P) + \text{Arg}(S_n(P) \overline{S_{n-1}(P)})$$

Si le nombre total de pas effectués est N_{pas} , l'algorithme calcule finalement:

$$15 \quad K_x(P) = \frac{\lambda}{2\pi} \frac{1}{2a} \theta_{N_{\text{pas}}}(P)$$

Le système effectue de même la détermination de $K_y(P)$ et $K_z(P)$, puis, par application des formules indiquées plus haut, l'algorithme calcule les valeurs de $x(P), y(P), z(P)$ en chaque point P . Le calcul complet peut n'être mené que pour une partie des points P , les points intermédiaires étant alors obtenus par interpolation linéaire.

20 Cette opération de calibrage fournit les positions de chaque point sous forme d'un tableau $C[d, c, k, l]$ où d est l'axe ($d = 0, 1, 2 \rightarrow x, y, z$), c est le numéro du capteur et k, l sont les indices du point considéré sur le capteur, et fournit la fonction G sous forme d'un tableau $G[c, k, l]$ avec les mêmes conventions.

Préalablement à l'utilisation du microscope il est également nécessaire d'enregistrer l'intensité
25 de l'onde de référence seule sur chaque pixel, ce qui génère un tableau $I_{\text{ref}}[c, k, l]$.

L'image calculée sera centrée autour d'un point M , normalement confondu avec O , mais qui peut s'en éloigner si la précision sur $R(P)$ est suffisante. On utilisera donc également le tableau

$w_M[d]$ des coordonnées du point M .

Préalablement à l'utilisation, l'algorithme précalcule un certain nombre de tableaux. Dans ces tableaux, c désigne le numéro du capteur, d une des coordonnées d'espace, k et l désignent l'indice du pixel ($T1$, $T2$) ou du point après suréchantillonnage (autres tableaux).

$$T1[c, k, l] = \frac{1}{6\sqrt{I_{ref}[c, k, l]}}$$

$$T2[c, k, l] = \frac{1}{2\sqrt{3I_{ref}[c, k, l]}}$$

$$U[d, c, k, l] = E \left(\frac{N}{n} \frac{C[d, c, k, l] - w_M[d]}{\sqrt{\sum_{d=0}^2 (C[d, c, k, l] - w_M[d])^2}} \right)$$

$$10 \quad V[c, k, l] = C[c, k, l] \exp \left\{ j \frac{2\pi}{\lambda} \left(\sqrt{\sum_{d=0}^2 (C[d, c, k, l])^2} - \sqrt{\sum_{d=0}^2 (C[d, c, k, l] - w_M[d])^2} \right) \right\}$$

Les trois figures de diffraction reçues en vue d'obtenir une représentation en trois dimensions forment un tableau $I[a, c, k, l]$ où a est l'indice correspondant à la prise de vue. Les opérations de génération du tableau H se résument alors à 4 étapes:

étape 1: parcourir l'ensemble des pixels en effectuant l'opération suivante, k et l variant de 0 à

15 $N_{pix} - 1$ sur chaque capteur:

$$S_{pix}[c, k, l] = T1[c, k, l](2I[0, c, k, l] - I[1, c, k, l] - I[2, c, k, l]) \\ + jT2[c, k, l](I[1, c, k, l] - I[2, c, k, l])$$

étape 2: Suréchantillonner et filtrer ce résultat, sur chaque capteur, de manière à compenser la fonction de transfert du capteur et à travailler sur un nombre de points supérieur au nombre de pixels.

20 Cette opération fournit le tableau $S[c, k, l]$ où k et l varient de 0 à $n_s N_{pix} - 1$, correspondant à la fonction $S(P)$.

étape 3: Parcourir l'ensemble des points P (suréchantillonnés) en effectuant:

$$\tilde{H}[U[0, c, k, l], U[1, c, k, l], U[2, c, k, l]]_+ = S[c, k, l]V[c, k, l]$$

étape 4: Effectuer la transformée inverse de \tilde{H} par une méthode de transformée rapide en trois dimensions, obtenant ainsi le tableau H .

Un déplacement du point d'observation M implique en plus un recalcul des tableaux U et V .

Le tableau $H[i, j, k]$ ainsi obtenu, dont les indices varient de $-N$ à $N-1$, représente l'onde lumineuse dans l'objet et peut être utilisé pour générer toute forme de représentation de cet objet.

L'algorithme peut en particulier calculer l'intensité lumineuse $L[i, j, k] = |H[i, j, k]|^2$ et la projeter suivant des directions choisies. Par exemple une projection sur le plan x, y sera obtenue par:

$$Proj[i, j] = \sum_k L[i, j, k]$$

L'algorithme peut procéder de manière semblable, sommant à chaque fois les intensités suivant une direction choisie, pour obtenir tous types de projections souhaités et en particulier des images stéréoscopiques, qui seront affichées selon des méthodes connues par ailleurs.

Dans certains cas, par exemple un échantillon comportant des éléments très mobiles, il n'est pas possible d'obtenir les trois enregistrements correspondant à des longueurs d'onde décalées. La représentation tridimensionnelle peut alors être obtenue à partir d'un seul enregistrement en remplaçant la formule donnant $S_{pix}(Q)$ par:

$$S_{pix}(Q) = \frac{I(Q) - I_{ref}(Q)}{\sqrt{I_{ref}(Q)}} \text{ ou } I(Q) \text{ représente l'intensité enregistrée pour l'unique figure de}$$

diffraction utilisée. La représentation tridimensionnelle obtenue est perturbée par des termes parasites

en $\frac{I(Q)}{I_{ref}(Q)}$ ainsi que par la présence d'un objet virtuel approximativement symétrique de l'objet réel

par rapport à la bille. L'onde de référence doit être suffisamment forte pour pouvoir négliger les termes

parasites en $\frac{I(Q)}{I_{ref}(Q)}$. La présence de l'objet virtuel est par contre inévitable. L'image obtenue est donc généralement de qualité moyenne. Par contre elle peut être parfaitement "instantanée".

Le calcul de $S_{pix}(Q)$ se répercute sur le mode de génération en quatre étapes de la représentation tridimensionnelle, ou seule l'étape 1 est modifiée et elle est remplacée par:

$$S[c, k, l] = \frac{1}{\sqrt{I_{ref}[c, k, l]}} I[c, k, l] - \sqrt{I_{ref}[c, k, l]} \text{ quand } I_{ref}[c, k, l] \text{ est supérieur au}$$

quart de sa valeur maximale, et $S[c, k, l] = 0$ sinon.

ou $I[c, k, l]$ est l'intensité de la figure de diffraction au point d'indices (k, l) du capteur numéro c et $I_{ref}[c, k, l]$ est l'intensité du faisceau d'éclairage seul en ce point.

L'éclairage de l'échantillon peut se faire par le haut aussi bien que par le bas. Afin d'améliorer la précision, des capteurs peuvent également être ajoutés sous l'échantillon. Le nombre de capteurs peut également être diminué, ce qui permet de diminuer le coût au prix d'une baisse de précision.

Selon un deuxième mode de réalisation, il n'y a pas d'onde de référence distincte du faisceau d'éclairage. Selon ce deuxième mode de réalisation:

Le faisceau émis par le laser (701) traverse un élargisseur de faisceau (703), puis un objectif de microscope (704) qui fait converger le faisceau vers un point de focalisation situé sous l'échantillon (705). Le faisceau traverse ensuite l'échantillon et est enregistré par le capteur (706). Le capteur est

plaqué sur un demi-cube (707). Le nombre de pixels dans la largeur du capteur est $N_{pix} = \alpha \frac{2r}{\lambda} \frac{l}{h}$ ou

r est le rayon du cercle défini par l'intersection du faisceau et du plan définissant la limite supérieure de l'échantillon, λ est la longueur d'onde dans le demi cube (707) du laser utilisé, l la largeur du capteur, h la distance entre le capteur et l'échantillon, et α est un nombre supérieur à 1, par exemple 1.4.

L'ensemble est protégé par une enceinte non représentée qui le protège de la lumière externe. Comme dans le dispositif précédent, l'échantillon est compris entre une lame (709) et une lamelle (711), l'ensemble étant maintenu par les éléments (708) et (710).

La représentation en trois dimensions de l'objet est obtenue à partir d'une seule figure de diffraction. La fonction $I_{ref}(Q)$ est remplacée par l'intensité enregistrée sur les capteurs en l'absence de l'échantillon, correspondant au faisceau d'éclairage seul, et pour un temps d'intégration égal à celui utilisé lors de l'enregistrement des figures de diffraction. La fonction $S_{pix}(Q)$ est alors calculée comme suit, $I(Q)$ représentant l'intensité enregistrée pour la figure de diffraction à partir de laquelle on cherche à calculer la représentation tridimensionnelle:

$$S_{pix}(Q) = \frac{I(Q) - I_{ref}(Q)}{\sqrt{I_{ref}(Q)}} \text{ quand } I_{ref}(Q) \text{ est supérieur au quart de sa valeur maximale, et}$$

$S_{pix}(Q) = 0$ pour les autres pixels.

La fonction $S(P)$ est obtenue à partir de $S_{pix}(Q)$ comme dans le premier mode de réalisation, avec toutefois $f_{max} = \frac{r}{\lambda h}$.

Le point O utilisé dans les formules est remplacé par le point de focalisation du faisceau. La fonction $G(P)$ vaut $G(P) = e^{i(\theta(P) - \theta(O) - \frac{2\pi}{\lambda} OP)}$ ou $\theta(P)$ est la phase de l'onde d'éclairage seule au

point P , $\theta(O)$ sa phase au point O , OP la distance de O à P , λ la longueur d'onde utilisée. $G(P)$ peut être calculé en fonction des caractéristiques des lentilles et des positions des points, par des méthodes connues. Cependant, on utilise ici une onde d'éclairage à symétrie de révolution autour d'un axe passant par O dont la taille du point de focalisation est raisonnablement faible, et dans ces

5 conditions on vérifie $G(P) = 1$.

Il n'y a pas de procédure de calibrage et la position géométrique des points est directement utilisée. Dans les formules qui suivent, h est la distance entre le point de focalisation et le centre du capteur, l est la largeur de la zone active du capteur, zone qui doit être carrée et centrée sur l'axe optique de l'objectif (704), et n_s est le facteur de suréchantillonnage.

$$10 \quad C[0, c, k, l] = \left(k - \frac{1}{2} n_s N_{pix}\right) \frac{L}{n_s N_{pix}}$$

$$C[1, c, k, l] = \left(l - \frac{1}{2} n_s N_{pix}\right) \frac{L}{n_s N_{pix}}$$

$$C[2, c, k, l] = h$$

Les formules donnant les tableaux U et V sont remplacées par:

$$U[d, c, k, l] = E \left(\frac{N}{n} \frac{C[d, c, k, l] - w_o[d] - w_{OM}[d]}{\sqrt{\sum_{d=0}^2 (C[d, c, k, l] - w_o[d] - w_{OM}[d])^2}} \right)$$

$$15 \quad V[c, k, l] = \exp \left\{ j \frac{2\pi}{\lambda} \left(\sqrt{\sum_{d=0}^2 (C[d, c, k, l] - w_o[d])^2} - \sqrt{\sum_{d=0}^2 (C[d, c, k, l] - w_o[d] - w_{OM}[d])^2} \right) \right\}$$

ou $w_o[d]$ est le tableau des coordonnées du point O , qui, contrairement au premier mode de réalisation, n'est pas forcément le centre de repère, et $w_{OM}[d]$ est le tableau des coordonnées du vecteur OM . Initialement on a $w_o[0] = w_o[1] = w_o[2] = w_{OM}[0] = w_{OM}[1] = 0$, et $w_{OM}[2]$ coordonnée du vecteur OM suivant l'axe vertical, est la distance entre le point de focalisation du

20 faisceau et le plan parallèle à la lame supportant l'échantillon et passant par le centre de cet échantillon. L'image est d'abord calculée avec ces valeurs, puis, lors d'une phase de mise au point, l'opérateur modifie manuellement (par exemple en entrant des valeurs par l'intermédiaire du clavier) les valeurs de $w_o[d]$. Il effectue cette opération en même temps qu'il visualise sur un écran l'image générée par le système, et cherche à obtenir l'image la plus nette possible. Il peut éventuellement modifier ensuite

25 $w_{OM}[d]$ s'il souhaite déplacer la zone d'observation.

Pour le reste le mode de calcul est le même que dans le premier mode de réalisation. Dans le mode de génération en quatre étapes de la représentation tridimensionnelle, seule l'étape 1 est modifiée et elle est remplacée par:

$$S[c, k, l] = \frac{1}{\sqrt{I_{ref}[c, k, l]}} I[c, k, l] - \sqrt{I_{ref}[c, k, l]} \text{ quand } I_{ref}[c, k, l] \text{ est supérieur au}$$

5 quart de sa valeur maximale, et $S[c, k, l] = 0$ sinon.

ou $I[c, k, l]$ est l'intensité de la figure de diffraction au point d'indices (k, l) du capteur numéro c et

$I_{ref}[c, k, l]$ est l'intensité du faisceau d'éclairage seul en ce point.

Le système de variation de phase étant supprimé, l'électronique de commande est simplifiée en conséquence. Il n'y a plus qu'une étape d'enregistrement au lieu de trois dans le cycle de prise d'image et
10 la commande des électro-aimants du dispositif de décalage de phase, représentée figure 5, est supprimée.

La représentation tridimensionnelle obtenue par cette méthode est semblable à celle obtenue par la première méthode dans le cas où on n'utilise qu'un seul enregistrement pour la générer. Cependant on ne maîtrise pas ici le rapport entre l'intensité diffractée et l'intensité non diffractée, ce qui
15 limite d'avantage les possibilités. L'image est perturbée par la présence d'une image symétrique de l'objet par rapport au point O et par un terme du second ordre par rapport à l'onde diffractée. En général elle est de bien moins bonne qualité qu'avec les deux autres modes de réalisation. L'avantage de ce mode de réalisation est cependant sa simplicité et sa faible sensibilité aux vibrations.

Un troisième mode de réalisation est illustré par la Fig. 8.

20 Selon ce mode de réalisation:

Un laser (800) émet un rayon qui traverse un filtre (801) puis est séparé en faisceaux d'éclairage et de référence par une lame semi-réfléchissante (802).

Le faisceau d'éclairage est ensuite réfléchi par un miroir (803) monté sur un support (804) permettant d'en régler l'inclinaison pour rediriger le faisceau vers la partie observée de l'objet (805).
25 L'objet (805) est lui-même supporté par un prisme (806). La face par laquelle le faisceau pénètre dans le prisme doit être orthogonale au faisceau. Le prisme est lié à un système de positionnement deux axes (807) permettant de déplacer l'ensemble prisme-objet dans le plan orthogonal à l'axe optique de l'objectif de microscope (810). Ce système est lui-même lié à un dispositif (808) permettant de régler l'inclinaison du plan de l'objet et à un dispositif de focalisation (809) permettant de déplacer l'objet
30 selon l'axe optique avec une précision de moins d'une longueur d'onde.

L'onde issue de l'objet (805) traverse l'objectif de microscope (810). Cet objectif est un objectif plan (qui donne une image plane d'un plan), à grande ouverture (par exemple 1.25), à immersion, et formant une image aggrandie de l'objet à une distance finie.

Dans le plan où l'objectif forme normalement l'image de l'objet à observer, on interpose un diaphragme (811) permettant un filtrage spatial de l'image. En arrière de ce plan on positionne un achromat (812) dont le plan focal objet doit être confondu avec le plan focal image de l'objectif (810). Un achromat identique (814) permet alors de reformer une image intermédiaire du plan focal image du microscope. Deux achromats (815) et (816) solidaires et montés sur un dispositif de translation (817) d'axe parallèle à l'axe optique permettent de reformer cette image dans le plan d'un CCD (818) lui-même montée sur un positionneur un axe (819), d'axe parallèle à l'axe optique.

Le faisceau de référence traverse d'abord un filtre (820) puis est réfléchi par un miroir (821) monté sur un translateur piézoélectrique (822). Il traverse ensuite une lentille (823) qui focalise le faisceau en un point. Le faisceau divergent issu de ce point est ensuite limité par un diaphragme (824) puis réfléchi partiellement par le miroir semi-réfléchissant (813), ce qui le superpose au faisceau issu de l'objet et permet d'enregistrer leurs interférences sur le CCD (818). Le point de focalisation du faisceau issu de la lentille (823) doit avoir son image virtuelle après réflexion sur le miroir semi-transparent (813) comprise dans l'image du plan du diaphragme par l'achromat (812). Le translateur piézoélectrique joue le rôle dédié dans le premier mode de réalisation au cristal électrooptique. En déplaçant le miroir sur de faibles distances (inférieures à la longueur d'onde) on obtient la modulation de phase recherchée.

Pour régler les positionneurs (817) et (819), on supprime l'objet et le faisceau de référence, et on règle l'angle d'arrivée du faisceau d'éclairage de sorte qu'il corresponde à l'ouverture maximale de l'objectif (810). On positionne alors conjointement (817) et (819) de sorte que l'image du faisceau d'éclairage soit aussi ponctuelle que possible et soit située sur le côté du capteur (aussi loin que possible du centre, tout en étant effectivement détectée). La position de (819) peut alors être affinée en envoyant le faisceau d'éclairage parallèlement à l'axe optique et en réglant (819) de manière à avoir l'image la plus ponctuelle possible. Les coordonnées (i_c, j_c) du point éclairé (point central du capteur) doivent être enregistrées.

Pour calibrer le système on utilise comme objet une grille plane de dimensions connues. L'onde lumineuse $S(P)$ reçue sur le CCD est calculée comme dans les modes de réalisation précédents. Puis on y applique une transformée de Fourier discrète bidimensionnelle inverse et on extrait du résultat l'intensité de l'onde en chaque point (carré du module de la valeur complexe obtenue par transformation inverse de Fourier), ce qui donne une image du plan objet. La position axiale de la grille et l'orientation de son plan sont alors réglés à l'aide de (808) et (807) de manière à ce que l'image soit la plus nette possible.

Les fréquences correspondant à un pixel du CCD de coordonnées (i, j) non suréchantillonnées sont:

$$f_x = \Delta f_x (i - i_c)$$

$$f_y = \Delta f_y (j - j_c)$$

$$f_z = \sqrt{f_m^2 - f_x^2 - f_y^2}$$

$$\text{avec } f_m = \frac{1}{\lambda}$$

- Dans l'image par transformation de Fourier inverse du capteur, la distance entre deux points
- 5 calculés correspond à une distance physique (N_{four} étant le nombre de points de la transformée de Fourier suivant chaque dimension):

- entre points adjacents sur l'axe x: $d_x = \frac{1}{N_{four} \Delta f_x}$

- entre points adjacents sur l'axe y: $d_y = \frac{1}{N_{four} \Delta f_y}$

- Les valeurs de Δf_x et Δf_y doivent être ajustées de manière que la taille physique de l'objet
- 10 calculée à l'aide des valeurs ci-dessus, soit bien respectée dans l'image en transformée de Fourier bidimensionnelle inverse de l'onde $S(P)$ reçue sur le CCD.

Lorsque les valeurs de Δf_x et Δf_y ont été déterminées, le mode de calcul de la représentation tridimensionnelle de l'objet est le même que dans le premier mode de réalisation, à ceci près que:

- les points M et O considérés dans les calculs sont confondus
- 15 -les fréquences sont maintenant calculées à partir des formules $f_x = \Delta f_x (i - i_c)$, $f_y = \Delta f_y (j - j_c)$.

$$f_z = \sqrt{f_m^2 - f_x^2 - f_y^2}$$

- la fonction $G(P)$ vaut 1.

Ceci se répercute sur le calcul des tableaux U et V :

$$U[0,0,k,l] = E \left(\frac{N}{n} \lambda \Delta f_x \frac{k - n_s i_c}{n_s} \right)$$

20 $U[1,0,k,l] = E \left(\frac{N}{n} \lambda \Delta f_y \frac{l - n_s j_c}{n_s} \right)$

$$U[2,0,k,l] = E \left(\sqrt{\left(\frac{N}{n} \right)^2 - (U[0,0,k,l])^2 - (U[1,0,k,l])^2} \right)$$

$$V[c,k,l] = 1$$

Le cycle de prise d'image étant le même que pour le premier mode de réalisation, l'électronique de commande est également semblable, à ceci près qu'il n'y a qu'un capteur au lieu de 12.

Si on génère la représentation tridimensionnelle à partir d'un seul enregistrement au lieu de trois, un objet virtuel symétrique de l'objet réel par rapport au point de focalisation de l'onde de référence est généré. Afin que cet objet virtuel ne se superpose pas à l'objet réel, il est nécessaire de décaler le point de focalisation (virtuel) de l'onde de référence pour l'amener sur le côté de l'ouverture (811). Ceci peut être réalisé en déplaçant l'ensemble (821)(822)(823)(824) dans le sens de l'axe optique.

L'avantage de ce mode de réalisation par rapport au premier est que l'ouverture (811) permet de sélectionner une petite portion de l'image et que l'onde de référence est centrée au milieu de l'image reconstituée dans l'ouverture (811) et non légèrement excentrée comme dans le premier mode de réalisation. Ceci permet, moyennant une réduction de la zone observée lors d'une prise d'image, d'utiliser beaucoup moins de capteurs. Par ailleurs le fait d'enregistrer des fréquences pures sur le capteur permet de générer en une seule transformation de Fourier une image plus grande que précédemment. Par contre, la limitation de l'ouverture du faisceau ne permet pas d'obtenir des résultats aussi précis que dans le premier mode de réalisation.

Dans une réalisation plus complète basée sur l'un des trois modes de réalisation, le laser unique peut être remplacé par un ensemble de plusieurs lasers commutant entre eux. En prenant successivement des images correspondant à des longueurs d'onde différentes, on peut reconstituer un effet de couleur. Un exemple de système de génération et de commutation du faisceau laser est représenté sur la figure 9.

Un premier sous-ensemble du système est constitué d'un laser (900) dont le faisceau traverse un élargisseur (901) puis un miroir semi-transparent (902). Il est alors séparé en deux faisceaux. L'un de ceux-ci traverse un filtre (903) puis un commutateur électro-optique (904). Un miroir semi-transparent (905) permet alors de le "mélanger" au faisceau principal F. L'autre faisceau est réfléchi par un miroir (906), traverse un filtre (907) puis un commutateur électro-optique (908). Un miroir semi-transparent (909) permet de le mélanger au faisceau principal.

Les commutateurs électro-optiques sont généralement constitués de cristaux placés entre polariseurs croisés, le cristal devenant biréfringent lorsqu'on lui applique un potentiel électrique. Le faisceau sortant d'un commutateur optique est polarisé et son intensité dépend de la tension appliquée, des taux d'extinction importants pouvant être obtenus. Le polariseur de sortie du commutateur (908) doit avoir son axe "passant" à angle droit de celui du polariseur de sortie du commutateur (904). De cette manière, chaque commutateur sélectionne une polarisation orthogonale et la superposition des deux donne un faisceau non polarisé.

Le sous-système formé des pièces (900) à (909) est répété deux fois: un deuxième sous-système est formé des pièces (910) à (919) et un troisième sous-système est formé des pièces (920) à (929). Ces trois sous-systèmes diffèrent entre eux par la longueur d'onde du laser utilisé, son intensité, les valeurs des filtres et les transmissivités des miroirs semi-transparentes. En jouant sur ces paramètres on peut

réglér la proportion de chaque longueur d'onde et de chaque direction de polarisation dans le faisceau de sortie F, dans le cas où tous les commutateurs électro-optiques sont ouverts.

Une représentation couleur est en fait la superposition de représentations monochromes à des longueurs d'onde différentes (typiquement Rouge Vert Bleu). Elle est obtenue en prenant

5 successivement plusieurs images correspondant à des longueurs d'onde différents. La séquence de prise d'image couleur sera donc:

- fermeture des commutateurs (924) (928) (914) (918) et ouverture des commutateurs (904) (908).
- prise d'une image monochrome à la longueur d'onde du laser (900)
- fermeture des commutateurs (924) (928) (904) (908) et ouverture des commutateurs (914) (918).
- 10 - prise d'une image monochrome à la longueur d'onde du laser (910)
- fermeture des commutateurs (914) (918) (904) (908) et ouverture des commutateurs (924) (928).
- prise d'une image monochrome à la longueur d'onde du laser (920)

A l'issue de cette séquence on a obtenu trois images monochromes, ce qui équivaut à une image couleur. Cette séquence peut être répétée indéfiniment pour obtenir une séquence d'images couleurs, de
15 la même manière que le système de base prend des séquences d'images monochromes.

L'électronique du système doit être complétée pour activer l'ouverture et la fermeture des commutateurs aux instants appropriés, permettant ainsi de réaliser des séquences d'images couleurs.

Une variante de ce système consiste à supprimer les pièces (902) (906) (907) (908) (909) (904), (912) (916) (917) (918) (919) (914), (922) (926) (927) (928) (929) (924). Les trois couleurs sont alors
20 présentes en même temps dans le faisceau et on peut utiliser un CCD couleur pour les séparer lors de la détection. Une seconde variante, basée sur la première, consiste à utiliser des lasers capables de délivrer des impulsions. Le mode de fonctionnement est alors celui décrit pour le système de base, où l'ouverture d'un commutateur est remplacée par l'activation directe du laser correspondant.

Afin d'améliorer la précision, on peut également travailler dans l'ultraviolet. Ceci implique en
25 particulier soit la diminution de la taille de l'objet illuminé soit l'augmentation du nombre de pixels des capteurs.

Ce microscope peut être utilisé au lieu de microscopes à transmission usuels, dans le domaine de la biologie par exemple, apportant d'avantage de confort et de précision. L'enregistrement en trois dimensions est particulièrement utile lorsque l'échantillon est constitué d'éléments mobiles (bactéries, spermatozoïdes, ...). Il permet alors d'examiner une scène sous tout angle jugé utile à posteriori, ou de
30 procéder à des comptages ou analyses diverses sur une image tridimensionnelle figée.

REVENDEICATIONS (1/2)

1. Microscope caractérisé par le fait qu'il numérise une ou plusieurs figures d'interférences produites par une onde diffractée par l'objet ou par la superposition d'une onde diffractée par l'objet et d'une onde de référence, et obtient par calcul une représentation en trois dimensions d'une partie de l'objet observé.
- 5 2. Microscope selon la revendication 1, caractérisé en ce que la représentation en trois dimensions de l'objet est obtenue à partir d'une seule figure d'interférences produite par la superposition de l'onde diffractée et d'une onde de référence.
- 10 3. Microscope selon la revendication 1, caractérisé en ce que la représentation en trois dimensions de l'objet est obtenue à partir de plusieurs figures d'interférences produites par la superposition de l'onde diffractée par l'objet et d'une onde de référence, et différant entre elles par la phase de l'onde de référence.
- 15 4. Microscope selon la revendication 3, caractérisé en ce que la variation de phase du faisceau est obtenue à l'aide d'une lame de cristal biréfringent uniaxial dont les deux faces sont recouvertes d'un matériau conducteur transmettant bien la lumière, en ce que son axe optique est orthogonal aux faces, en ce que le faisceau à moduler se propage perpendiculairement aux faces de la lame qu'il traverse, et en ce que l'application d'une différence de potentiel entre les faces fait varier les indices de réfraction de la lame correspondant aux deux directions de polarisation du faisceau incident, ces deux indices restant cependant égaux entre eux.
- 20 5. Microscope selon une des revendications 3 ou 4, caractérisé en ce qu'on utilise trois figures d'interférences pour obtenir une représentation en trois dimensions, et que la phase de l'onde de référence est décalée de 120 degrés entre chacune de ces figures.
- 25 6. Microscope selon une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'onde diffractée issue de l'objet se dirige à travers un milieu d'indice constant vers des capteurs placés à proximité.
- 30 7. Microscope selon une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'une image intermédiaire de l'objet est d'abord formée à l'aide de lentilles et filtrée spatialement.
- 35 8. Microscope selon la revendication 7, caractérisé en ce que les figures d'interférences sont formées par des lentilles, et en ce que chaque point du capteur correspond à une fréquence pure de l'onde issue de l'objet.
- 30 9. Microscope selon une des revendications 2 à 8, caractérisé en ce que l'onde de référence est approximativement sphérique et centrée sur un point proche de l'objet ou d'une image intermédiaire de celui-ci.
- 35 10. Microscope selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'onde lumineuse de référence est obtenue par réflexion d'un faisceau laser sur une bille placée à proximité de l'objet à observer.
- 35 11. Microscope selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'un miroir semi-transparent est utilisé pour superposer l'onde de référence et l'onde diffractée par l'objet.

REVENDICATIONS (2/2)

12. Microscope selon une des revendications 2 à 6 ou 9 ou 10, caractérisé en ce que, dans une phase de calibrage, une source ponctuelle est déplacée dans la zone d'observation, et en ce que des paramètres caractéristiques du système sont déduits des valeurs enregistrées sur les capteurs lors de ce déplacement.

5 13. Microscope selon une des revendication 1 ou 6, caractérisé en ce que les figures d'interférence résultent de la seule onde lumineuse ayant traversé l'objet.

14. Microscope selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que les moyens de calcul comportent des premiers moyens pour calculer au niveau des capteurs l'onde lumineuse diffractée par l'objet observé seul, ou une approximation de cette onde, des seconds moyens permettant de calculer la
10 représentation fréquentielle de l'onde lumineuse dans une partie de l'objet observé, et des troisièmes moyens pour effectuer une transformée de Fourier inverse de cette représentation fréquentielle.

15 15. Microscope selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que plusieurs faisceaux lasers de longueurs d'onde différentes sont utilisés, en ce que chaque faisceau traverse un système de commutation électro-optique, en ce que l'ensemble des faisceaux sont ensuite superposés en un seul faisceau de sortie à l'aide de miroirs semi-transparentes, et en ce que par ouverture et fermeture des commutateurs électro-optiques on obtient successivement des représentations tridimensionnelles correspondant à des longueurs d'onde différentes, dont la superposition permet de reconstituer un effet de couleur.

1/9

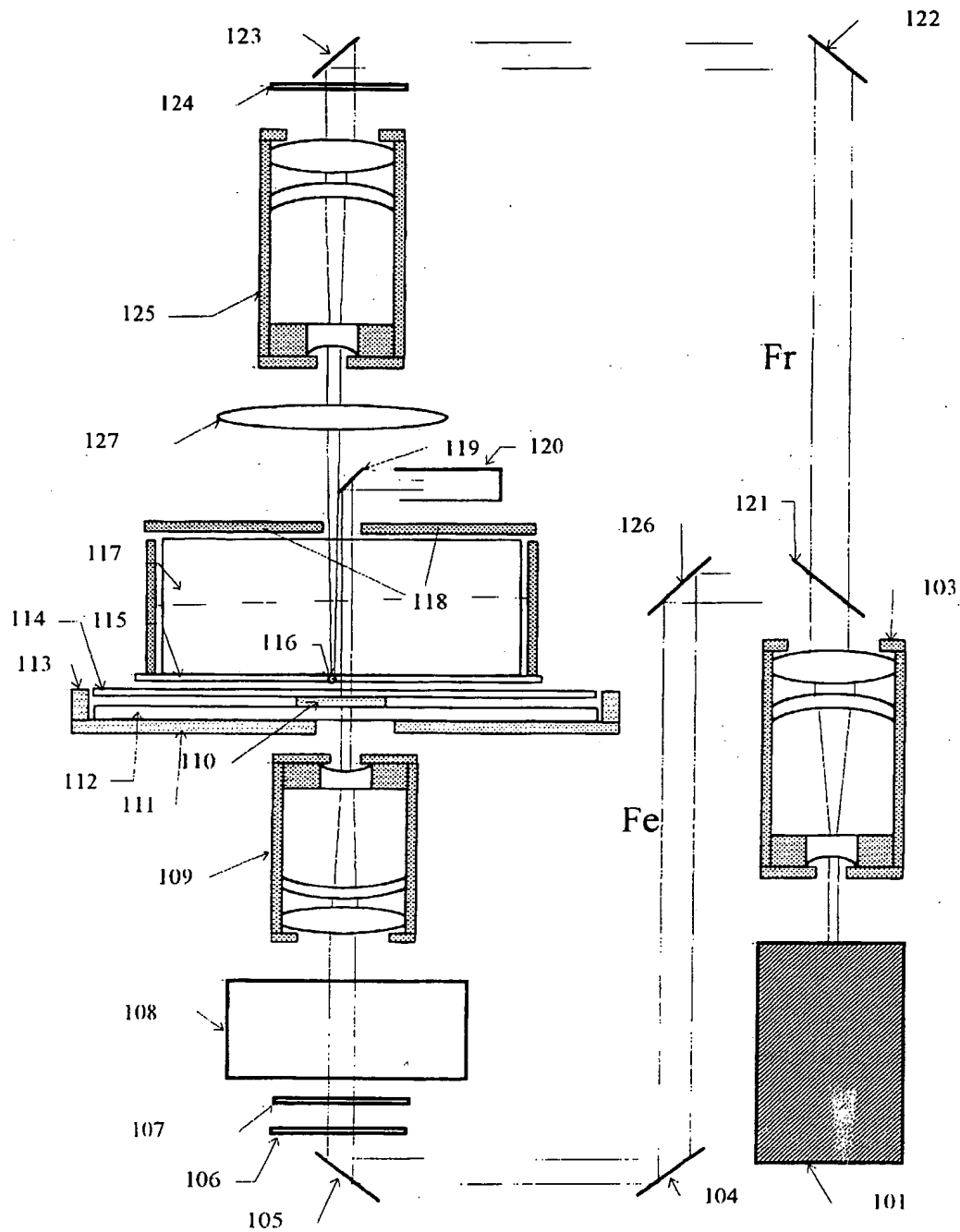


FIG. 1

2/9

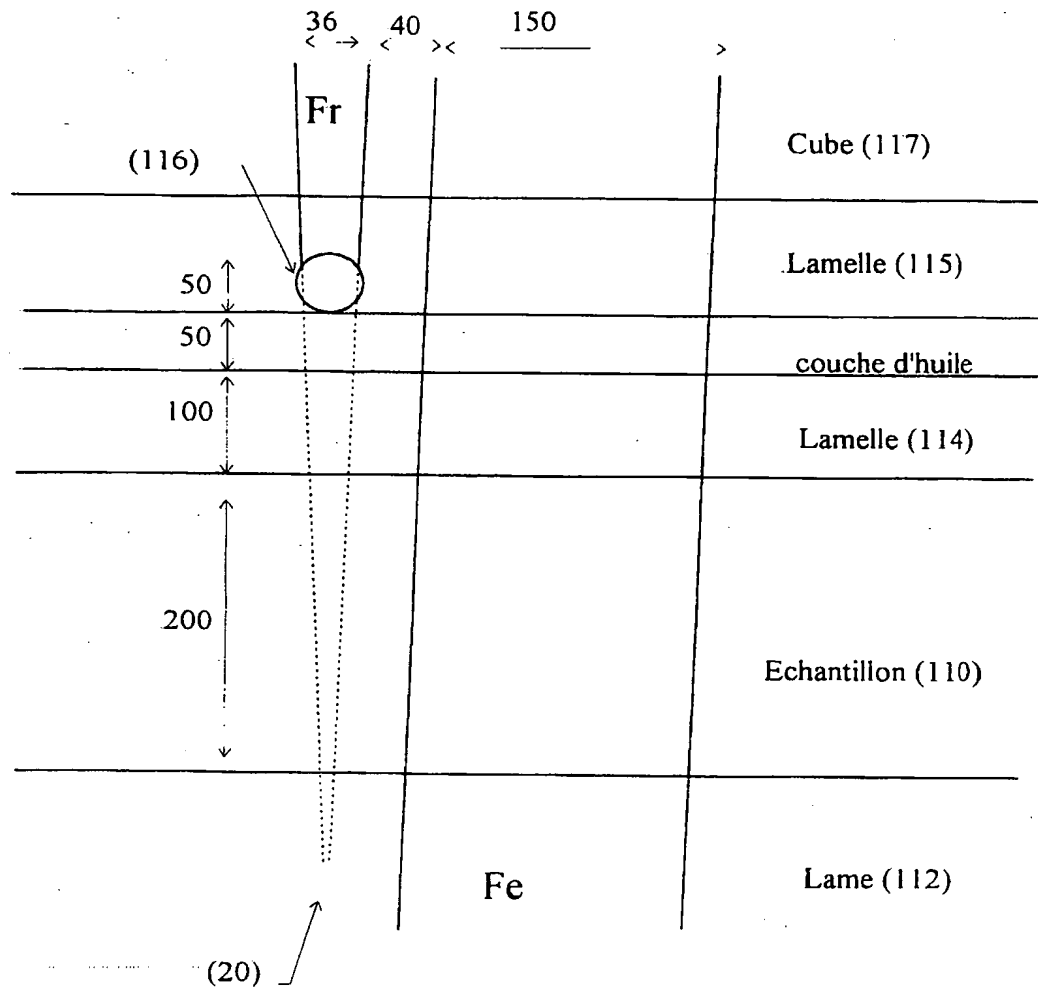
Dimensions en μm

FIG.2

3/9

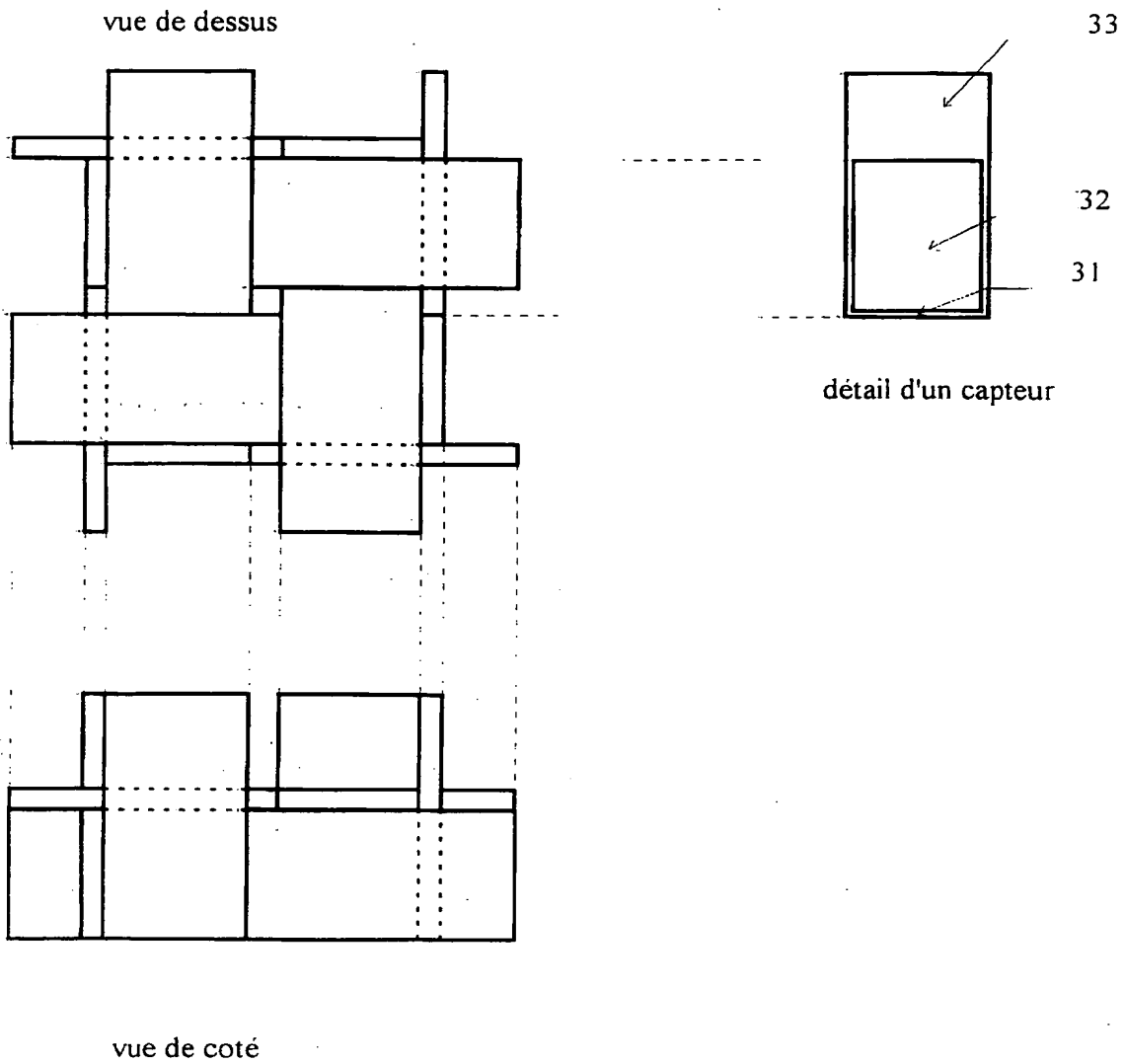


FIG.3

4/9

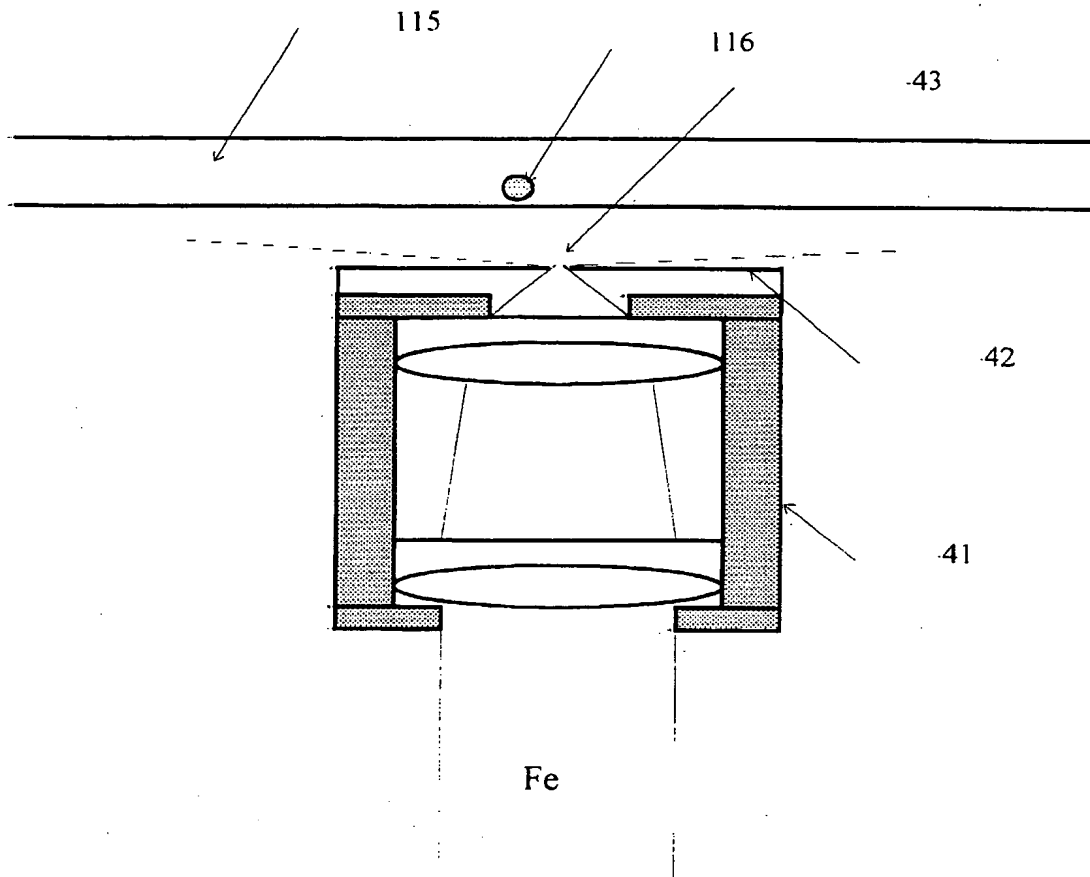


FIG.4

5/9

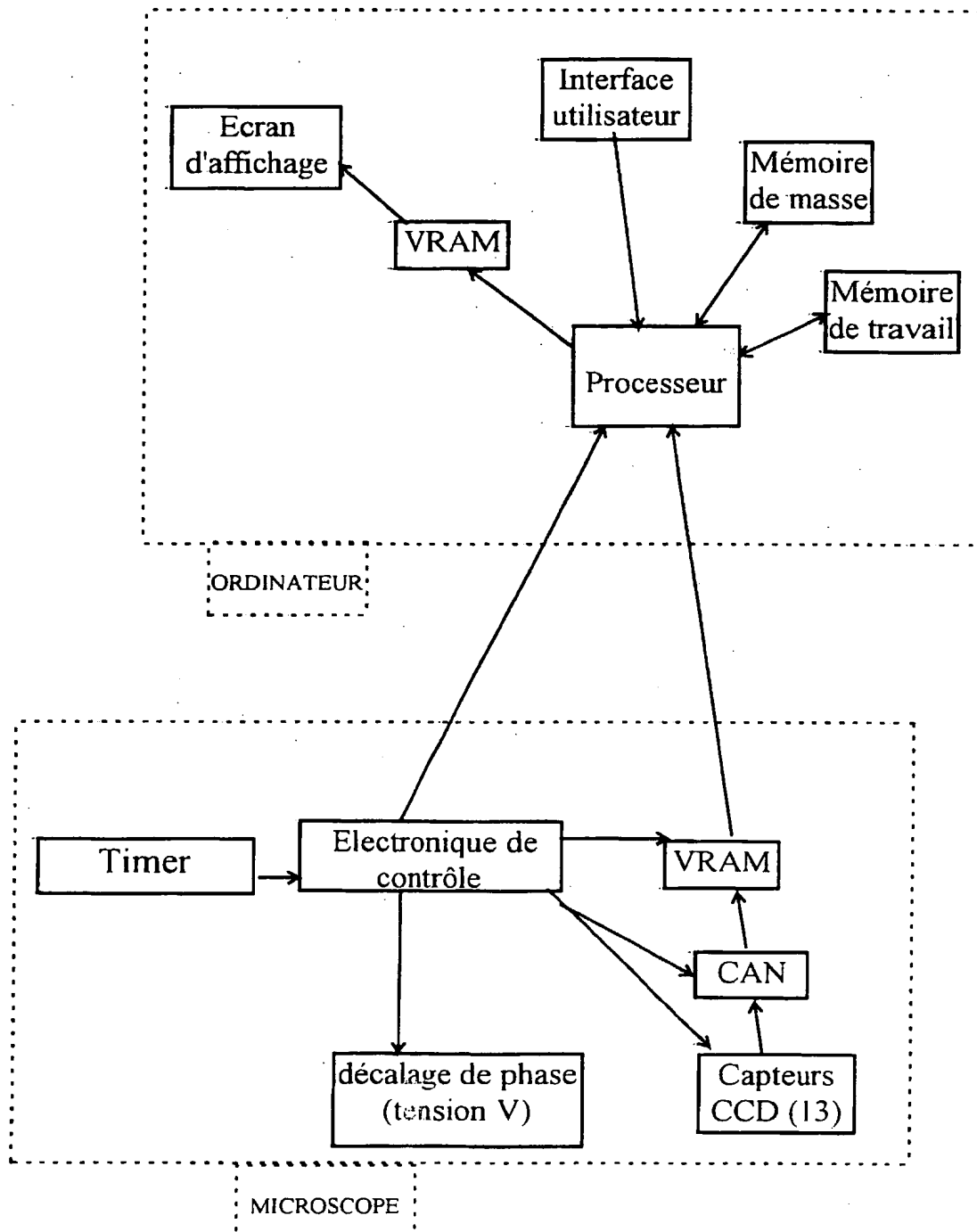


FIG.5

6/9

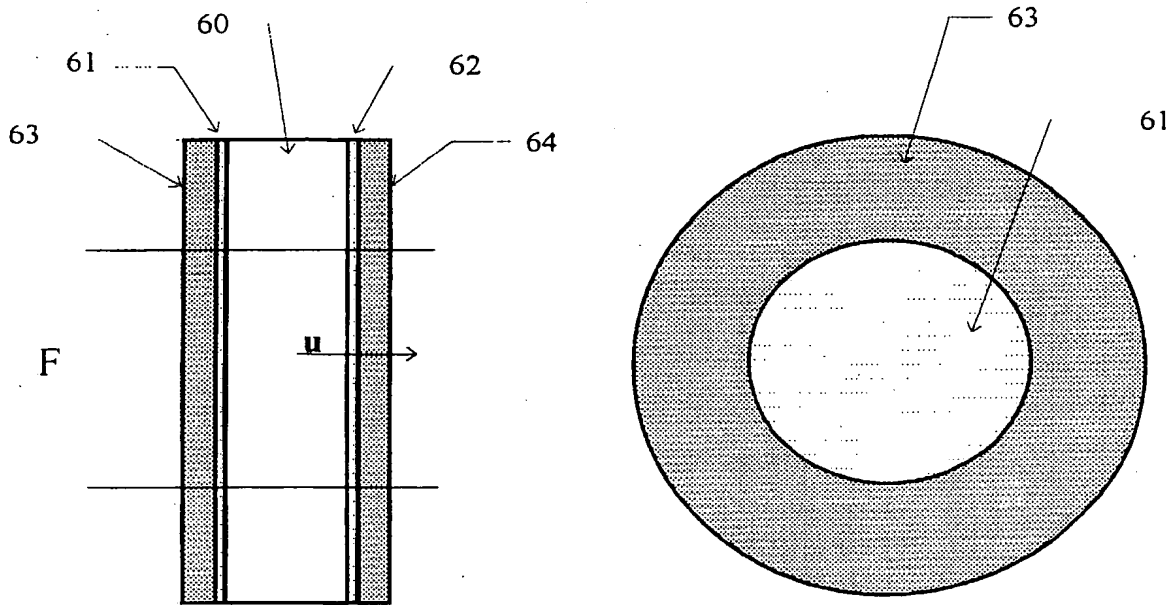


FIG. 6

7/9

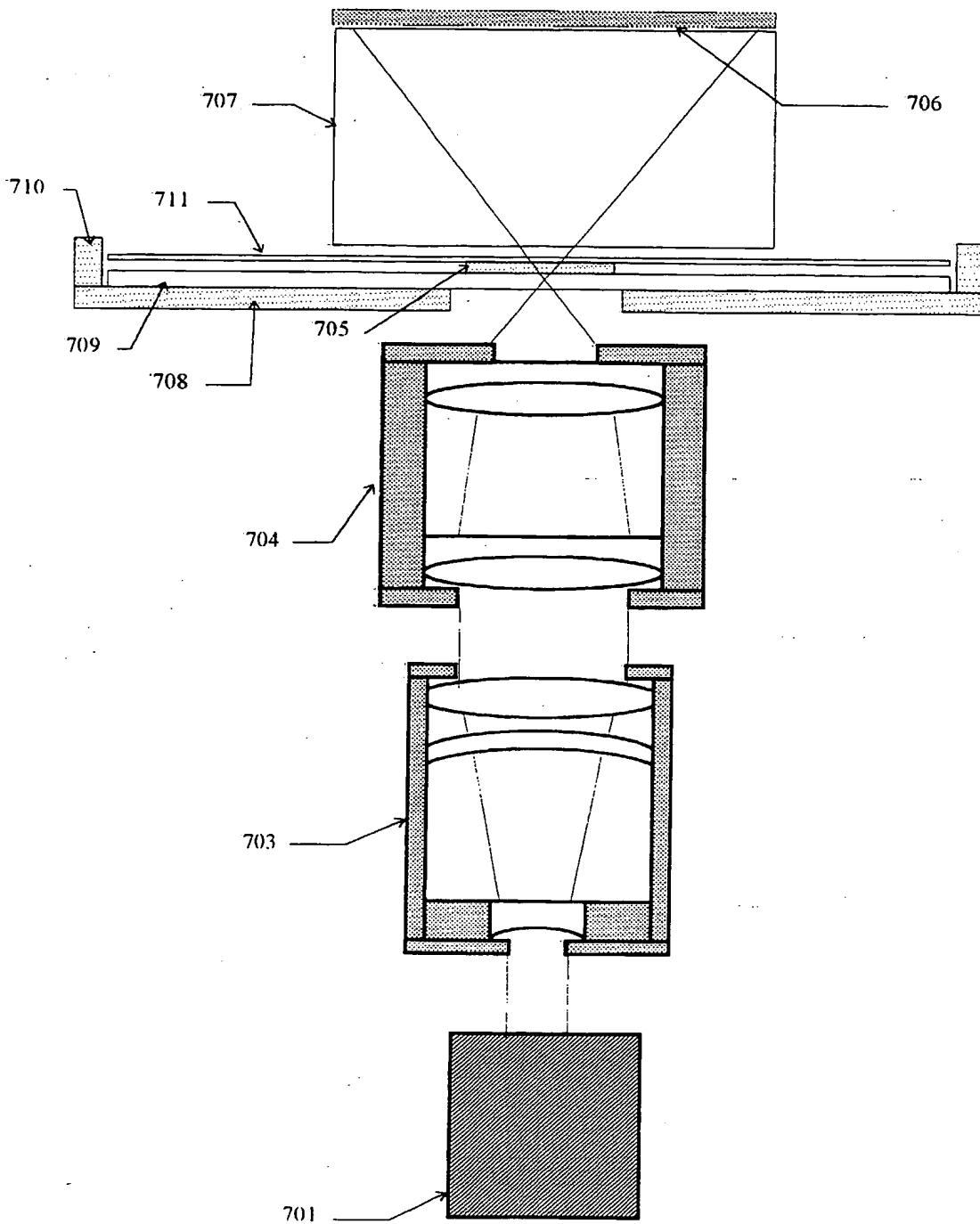


FIG. 7

8/9

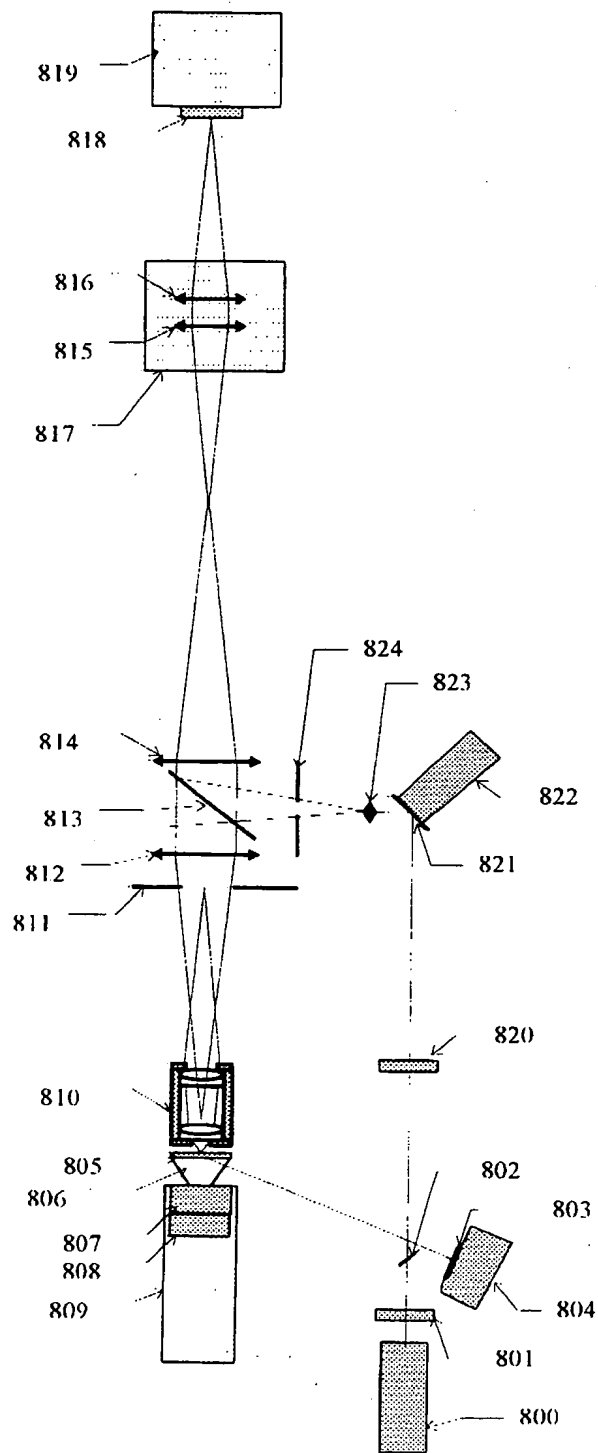


Fig. 8

9/9

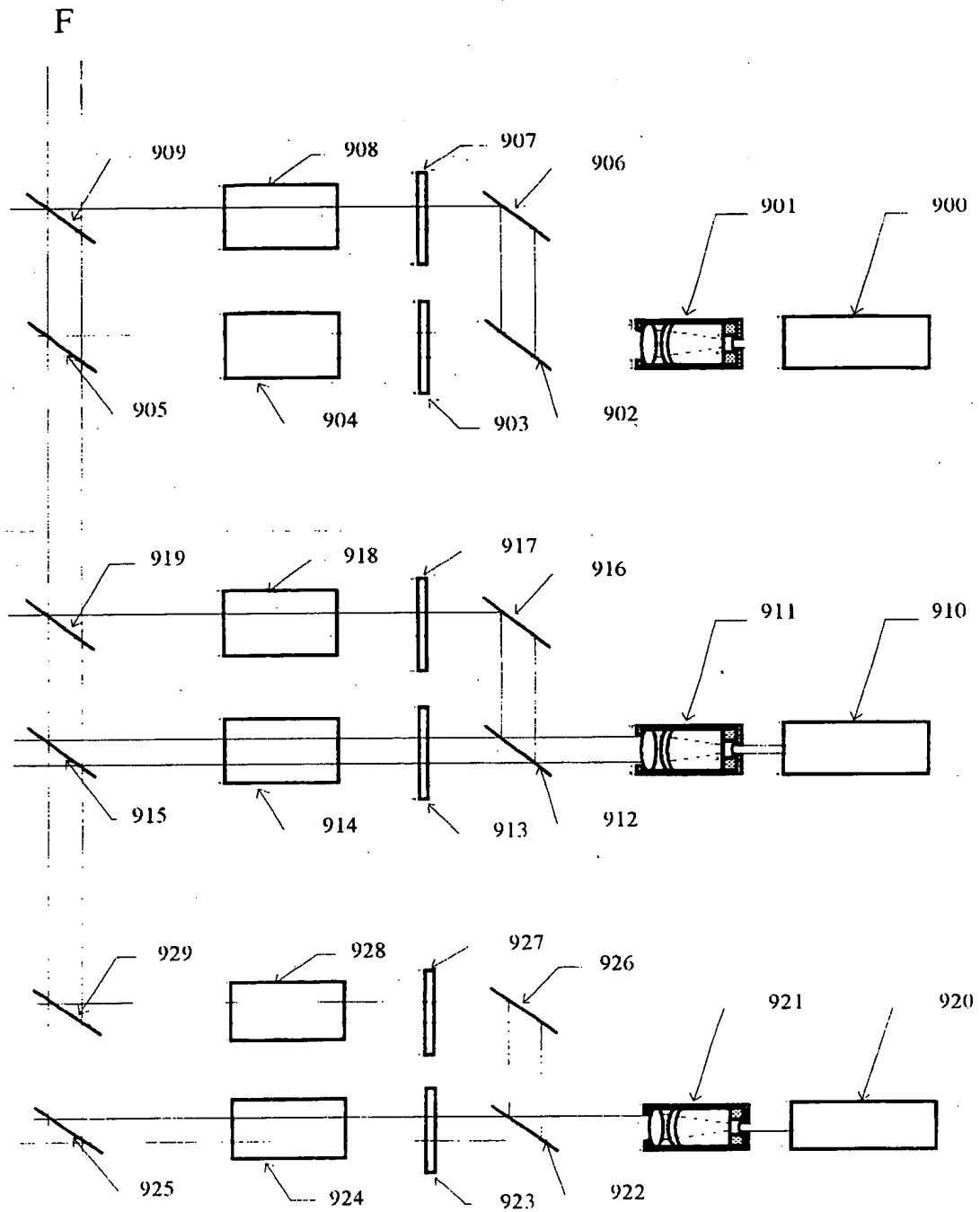


Fig.9